

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 327–335

Zur Biochemie der Spurenelemente Zink, Kupfer, Mangan, Molybdän, Chrom und Kobalt: Verteilung, Bindung und Regulation durch Nebennierenrinden-Hormone

Von T. Günther, B. Ruhe, J. Schmalbeck und Nahib Tehrani

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik und Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 23. Oktober 1973/1. März 1974)

Die Spurenelemente Cu, Mn, Mo und Co sind in der Leber charakteristisch auf die Zellfraktionen, Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma, verteilt. Bei den einzelnen Spurenelementen sind der Gehalt und die Verteilung nach Adrenalectomie in unterschiedlicher Weise geändert. Der nach Adrenalectomie erhöhte Cu-Gehalt der Leber wird durch Cortison normalisiert.

Die untersuchten Spurenelemente werden im Cytoplasma zumeist an drei Fraktionen von Proteinen gebunden. Diese haben ein Molekulargewicht von etwa 120 000, 30 000 und 9 000. Die Verteilung der Metallionen auf die Proteinfractionen weist eine typische Zeitabhängigkeit auf, die durch den intrazellulären turnover der Spurenelemente bedingt ist. Durch vergleichende Inkubation von Cytoplasma mit radioaktiven Spurenelementen *in vitro* wurde wahrscheinlich gemacht, daß einige Spurenelemente bei der Synthese ihrer Bindungsproteine irreversibel eingebaut werden. Für die Bindungsproteine wird eine Speicher- und Schutzfunktion diskutiert.

Nach Zugabe von radioaktiven Spurenelementen zu Serum und dessen elektrophoretischer Auftrennung wurden Co im Albumin, Mn im β -Globulin (Transferrin), Zn im α_2 -Globulin und Cr im α -Globulin und β -Globulin (Transferrin) gefunden. Nach Adrenalectomie war der Gehalt an Cu, Mn und Cr im Serum erhöht, der an Mo erniedrigt.

Biochemistry of the trace elements Zn, Cu, Mn, Cr and Co: Distribution, binding and regulation by adrenal hormones

In the liver, the trace elements Cu, Mn, Mo and Co show a characteristic distribution between nucleus, mitochondria, microsomes and cytoplasm. The concentration and distribution of each trace element show specific changes after adrenalectomy. The increase in the concentration of Cu in the liver after adrenalectomy is normalized by cortisone.

In the cytoplasm, the trace elements are bound by, at the most, three different protein fractions: molecular weights approximately 120 000, 30 000 and 9 000. The distribution of the metal ions amongst these protein fractions shows a typical time dependence, which results from the intracellular turnover of the trace elements. From comparative incubations of cytoplasm with radioactive trace elements *in vitro*, it seems likely that some trace elements become irreversibly incorporated during the synthesis of their binding proteins. A storage and protection function is suggested for the binding proteins.

After the addition of radioactive trace elements to serum and electrophoretic separation, Co was bound in the albumin fraction, Mn in the β -globulin (transferrin), Zn in the α_2 -globulin and Cr in the α -globulin and β -globulin (transferrin). After adrenalectomy, the concentrations of Cu, Mn and Cr in the serum were increased, and Mo was decreased.

Spurenelemente wurden in zunehmendem Maße als Bestandteile von Enzymen identifiziert (1, 2). Dies dürfte ihre wesentliche biologische Funktion sein.

Der Gehalt an Spurenelementen in einem Organ ist jedoch höher als sich durch ihr Vorkommen in Enzymen erklären läßt. Vom Zn z. B. sind nicht mehr als 5 % in Enzymen (Dehydrogenasen, Carboanhydrase, alkalische Phosphatase) enthalten (3). Der Rest ist wegen der guten chelatbildenden Eigenschaften dieser Elemente in der Zelle gebunden, z. B. an Proteine. Deshalb führt wahrscheinlich Zn-arme Ernährung auch kaum zu einer Aktivitätsabnahme Zn-enthaltender Enzyme (4). Der Transport der resorbierten Spurenelemente erfolgt im Plasma ebenfalls nach Bindung an Proteine, wobei für die verschiedenen Elemente unterschiedliche Transportproteine verwendet werden. Nach ihrem Transport durch die Zellmembran werden radioaktiv markierte Spurenelemente wie ^{67}Cu , ^{65}Zn (oder ^{109}Cd) (5–8) an Proteine gebunden und von diesen später in andere

Bindungsproteine des Cytoplasmas überführt. Zusätzlich werden die Spurenelemente in den übrigen Zellorganellen (Kern, Mitochondrien und Mikrosomen) gebunden, in denen sie je nach Element und Zellfraktion in unterschiedlicher Menge nachweisbar sind (9).

Die Spurenelemente des Organismus befinden sich offenbar in einem regulierbaren dynamischen Gleichgewicht, denn der Zn-Gehalt der Leber z. B. ist nach Adrenalectomie erhöht und wird durch Glucocorticoide wieder normalisiert (10).

Durch die Entwicklung der Atomabsorptionsspektrophotometrie (Graphitrohrküvette) ist die Nachweisgrenze erheblich gesenkt worden, so daß wir unsere früheren Untersuchungen am Zn (10) auf weitere Spurenelemente, die in geringerer Konzentration vorkommen, ausdehnen konnten.

Es wurde damit auch möglich, die Verteilung von Spurenelementen auf die Zellorganellen zu bestimmen.

Zur weiteren Aufschlüsselung der Verteilung wurden die mit radioaktiven Spurenelementen markierten Proteine des Cytoplasmas aufgetrennt.

Im einzelnen wurden bestimmt:

1. Gehalt im Organ	Mn	Cu	Mo	Cr	Co	—
2. Gehalt in den Organellen	Mn	Cu	Mo	—	Co	—
3. Radionuklide im Cytoplasma nach i.v.-Injektion	Mn	—	Mo	—	Co	Zn
4. Radionuklide im Cytoplasma nach in vitro-Zugabe	Mn	—	—	Cr	Co	Zn
5. Radionuklide im Cytoplasma nach Vorbehandlung mit Cd	Mn	—	—	—	Co	Zn
6. Radionuklide im Serum nach in vitro-Zugabe	Mn	—	—	Cr	Co	Zn

Methodik

Die Versuche wurden mit 200–250 g schweren Wistar-Ratten durchgeführt, die Altromin und Leitungswasser ad libitum erhielten. Die Ratten wurden in Äthernarkose transabdominell adrenaletomiert. Je 6 der adrenaletomierten Tiere wurden mit 5 µg D, L-Aldosteronacetat/Tag bzw. 8 mg Cortisonacetat/Tag – insgesamt 7 Tage lang – substituiert. Die Vorbehandlung der Tiere, die Entnahme und Gefrier-trocknung der Organe wurde früher ausführlich beschrieben (11). Bei Vorbehandlung mit Cd^{2+} wurden den Tieren 24 h vor dem Versuch (Injektion der Radionuklide) 22 µmol/kg Gewicht CdCl_2 in 1 ml 9 g/l NaCl i. p. injiziert.

Veraschung

Je nach Gehalt wurden 4–280 mg vom Trockenpulver der Organe oder Zellfraktionen bzw. bei Mn, Mo und Cr 10–70 mg gefriergetrocknetes Serum von Tieren, denen keine Radionuklide injiziert worden waren, in Durangläsern (ϕ 12 mm, Höhe 10 mm) bei 300–400 Watt und 1 Torr O_2 12 h lang im low temperature asher 505 der Firma Tracerlab verascht. Der Rückstand wurde in 0,1 mol/l HCl aufgenommen.

Atomabsorptionsspektrophotometrie

Die quantitative Bestimmung der Spurenelemente wurde mit dem Gerät der Firma Perkin-Elmer, Modell 300, mit Graphit-rohrküvette und Deuteriumkompensator durchgeführt. Die eingebrachten Proben (10–50 µl) wurden bei 100°C für 20–50 s getrocknet und bei 1000°C für 60–90 s thermisch zersetzt. Die Atomisierung erfolgte bei der Bestimmung von Co, Cr, Cu und Mn bei etwa 2400°C und bei der Bestimmung von Mo bei etwa 2500°C.

Tab. 1. Verwendete Radionuklide und deren Dosierung.

Die Radionuklide wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen.

Radionuklide	gelöst in	spez. Akt. mCi/mg Element	i. v. Injektion (µCi/Ratte)		Inkubation in vitro (µCi/ml)
			30 min	24 h	
$^{54}\text{MnCl}_2$	0,1 mol/l HCl	> 100	60	60	0,13
$^{65}\text{ZnCl}_2$	0,1 mol/l HCl	> 100	100	150	0,25
$^{60}\text{CoCl}_2$	H_2O	50–150	60	85	0,1
$^{51}\text{CrCl}_3$	9 g/l NaCl, pH 3–4	50–150	—	—	0,1
$(\text{NH}_4)_2^{99}\text{MoO}_4$	H_2O	3–6	375	375	—

Die verwendeten Wellenlängen waren bei Co 240,7 nm, Cr 357,8 nm, Cu 324,7 nm, Mn 279,5 nm und Mo 313,3 nm. Die Eichlösungen wurden aus p. a.-Reagenzien in 0,1 mol/l HCl hergestellt.

Zellfraktionierung

Zur Zellfraktionierung wurde ein 10proz. Homogenat der frisch entnommenen Lebern in gekühlter 0,25 mol/l Saccharose nach Schneider und Hogeboom (12) fraktioniert zentrifugiert, jeweils einmal gewaschen und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Spurenelementen wurde auf den Proteingehalt der Zellfraktionen bezogen, der nach Kjehtdahl bestimmt wurde.

Gelfiltration

Zur Untersuchung des Verhaltens der Spurenelemente im Cytoplasma wurden die Radionuklide in neutraler, isotoner NaCl-Lösung intravenös injiziert. (Dosierung s. Tab. 1.) 30 min und 24 h p. i. wurden den Tieren in Äthernarkose Blut zur Serumgewinnung und die Leber entnommen. Die Leber wurde in 0,25 mol/l Saccharose homogenisiert und die Überstandsfraction durch 60 min. Zentrifugieren bei 100 000 g gewonnen.

Parallel hierzu wurde die Überstandsfraction von normalen Ratten, denen keine Radionuklide injiziert wurden, 60 min bei 37°C mit trägerfreiem Radionuklid gemäß Tabelle 1 unter Schütteln inkubiert.

Jeweils 1 ml dieser Überstandsfractionen wurde auf einer Säule (Firma Pharmacia, 92 cm × 1,8 cm, $V_0 = 60,4$ ml), die mit Sephadex G 100 gefüllt war, mit 0,05 mol/l Tris Cl, pH 7,5 in 0,1 mol/l NaCl bei Raumtemperatur (22°C) getrennt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,2 ml/min. Fraktionen zu je 2 ml wurden aufgefangen.

In diesen Fraktionen wurde die Radioaktivität im NaJ-Bohrloch-Kristall (Firma Frieske-Berthold) und der Proteingehalt photometrisch bei 278 nm gemessen.

Serumelektrophorese

Serum von normalen und adrenaletomierten Ratten wurde 60 min bei 25°C mit 50 µCi/ml des trägerfreien Radionuklids geschüttelt. Die Trennung der Serumproteine erfolgte auf Celluloseacetatmembranen in 0,07 mol/l Veronalpuffer pH 8,6 bei einer Spannung von 200 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Albuminfraktion etwa 8 cm gewandert war. Die Radioaktivität der Elektropherogramme wurde im Dünnschichtscanner der Firma Frieske und Berthold ausgemessen. Die Proteinbanden wurden zum Vergleich mit Ponceau S angefärbt und photometriert.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluß der Nebennierenrinde auf den Gehalt an Cu, Mn, Mo und Cr in Leber, Muskel und Serum (Tab. 2)

Wie früher (10) beim Zn gefunden, wird auch der Gehalt an Cu in der Muskulatur von der Nebennierenrinde nicht beeinflusst. In der Leber dagegen sind der Zn- und Cu-Gehalt nach Adrenaletomie erhöht. Substitution mit Cortison, nicht aber mit Aldosteron, bewirkt ihre

Tab. 2. Wirkung von Nebennierenrinden-Hormonen auf den Gehalt an Mn, Cu, Mo und Cr in Leber, Muskel und Serum von je 6 Ratten. Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes.

	Leber				Muskel		Serum			
	Mn	Cu	Mo	Cr	Mn	Cu	Mn	Cu	Mo	Cr
	$(\mu\text{mol/kg Trockensubstanz})$				$(\mu\text{mol/l})$					
Normale Tiere	166 $\pm 3,5$	225 $\pm 4,9$	19,0 $\pm 1,2$	5,0 $\pm 0,5$	12,0 $\pm 0,2$	97,6 $\pm 6,3$	0,149 $\pm 0,040$	16,1 $\pm 0,4$	0,064 $\pm 0,009$	1,16 $\pm 0,22$
Adrenalektomierte Tiere	107 $\pm 6,7$	300 $\pm 7,6$	18,8 $\pm 1,0$	4,7 $\pm 1,0$	10,4 $\pm 0,3$	105 $\pm 8,9$	0,214 $\pm 0,033$	35,5 $\pm 2,3$	0,046 $\pm 0,004$	2,00 $\pm 0,22$
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron	120 $\pm 5,7$	355 $\pm 10,5$	21,1 $\pm 0,6$	1,8 $\pm 0,1$	9,9 $\pm 0,5$	94,1 $\pm 7,2$	—	—	—	—
Adrenalektomierte Tiere + Cortison	102 $\pm 4,9$	236 $\pm 12,0$	11,6 $\pm 0,5$	3,0 $\pm 0,2$	10,5 $\pm 0,6$	105 $\pm 5,0$	—	—	—	—

Normalisierung. Diese gleichsinnige Beeinflussung von Zn und Cu mag darauf beruhen, daß beide Elemente im Cytoplasma der Leberzelle z. T. von den gleichen Proteinen gebunden werden können (s. unten). Für Metallothionein ist dies erwiesen (7, 13, 14).

Mn wird in Leber und Muskel durch Nebennierenrinden-Hormone beeinflusst, die Veränderungen im Skelettmuskel sind jedoch geringer. Nach Adrenalektomie ist der Gehalt an Mn intrazellulär erniedrigt und wird weder durch Aldosteron noch durch Cortison allein in der gewählten Dosierung normalisiert. Der Gehalt an Mo und Cr ist nach Adrenalektomie unverändert.

Der Gehalt an Mo wird aber durch Cortison, der an Cr durch Aldosteron gesenkt. Dies könnte auf unphysiologischer Dosierung beruhen.

Im Serum war nach Adrenalektomie der Gehalt an Mn, Cu und Cr angestiegen, der an Mo gesunken. Der Co-Gehalt war so niedrig, daß er nicht exakt meßbar war.

Cu und Zn verhalten sich demnach im Serum im Gegensatz zur Leber nicht gleichartig. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Zn und Cu im Serum an verschiedene Bindungsproteine gebunden werden. Zn wird an ein α_2 -Globulin (15), Cu an Caeruloplasmin (1) und Transferrin (β_1 -Globulin) (16) gebunden.

Offen bleibt, ob die von Nebennierenrinden-Hormonen abhängige Verteilung der Spurenelemente zwischen Intrazellulärraum und Serum durch einen geänderten Gehalt an Bindungsproteinen in diesen Räumen bedingt ist, oder ob der Transport der Spurenelemente in die Zelle und heraus durch Hormone beeinflusst wird.

Intrazelluläre Verteilung bei normalen und adrenalektomierten Ratten

Um zu sehen, in welcher Zellfraktion eine Änderung des Gehalts an Spurenelementen erfolgt, untersuchten wir ihre subzelluläre Verteilung (Tab. 3). Die Zunahme

Tab. 3. Subzelluläre Verteilung von Mn, Cu, Mo und Co in den Lebern von normalen und adrenalektomierten Ratten. Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes von jeweils Fraktionierungen.

	Normale Tiere				Adrenalektierte Tiere			
	Cu	Mn	Mo	Co	Cu	Mn	Mo	Co
	$(\mu\text{mol/kg Protein})$							
Gesamtleber	357,8 $\pm 8,6$	268,2 $\pm 10,2$	23,9 $\pm 0,6$	3,2 $\pm 0,1$	435,5 $\pm 16,4$	168,3 $\pm 8,1$	26,5 $\pm 1,3$	5,5 $\pm 0,4$
Kerne	500,0 $\pm 18,4$	468,8 $\pm 11,2$	24,4 $\pm 0,7$	4,1 $\pm 0,6$	537,5 $\pm 10,1$	337,0 $\pm 18,5$	35,9 $\pm 1,5$	6,4 $\pm 0,4$
Mitochondrien	414,8 $\pm 19,7$	490,4 $\pm 29,7$	45,9 $\pm 5,6$	7,0 $\pm 1,2$	264,4 $\pm 12,4$	206,3 $\pm 11,6$	24,0 $\pm 2,1$	20,7 $\pm 1,2$
Mikrosomen	152,6 $\pm 17,6$	175,2 $\pm 13,5$	13,4 $\pm 1,4$	2,4 $\pm 0,2$	152,8 $\pm 5,0$	152,0 $\pm 4,0$	18,6 $\pm 0,8$	5,1 $\pm 0,3$
Überstand	352,3 $\pm 27,1$	49,0 $\pm 6,9$	65,4 $\pm 4,9$	3,2 $\pm 0,3$	576,6 $\pm 19,8$	56,9 $\pm 2,7$	41,2 $\pm 2,0$	3,3 $\pm 0,7$

des Cu-Gehalts nach Adrenalectomie, die auch von anderen gefunden wurde (17), ist auf eine Zunahme des Cu im Cytoplasma zurückzuführen. Diese ist so hoch, daß die Abnahme des Cu in den Mitochondrien überkompensiert wird.

Die Abnahme des Mn-Gehalts erstreckt sich auf die Kerne, Mikrosomen und besonders die Mitochondrien.

Der Gehalt an Mo im Gesamtorgan bleibt zwar konstant, es gibt aber innerhalb der Zellfraktionen Verschiebungen. Der Mo-Gehalt in den Kernen und Mikrosomen nimmt zu, in Mitochondrien und Cytoplasma nimmt er ab.

Der Gehalt an Co nimmt nach Adrenalectomie zu. Diese Zunahme zeigt sich an den Kernen und Mikrosomen und in besonders hohem Maße an den Mitochondrien, nicht aber im Cytoplasma.

Jedes der Elemente zeigt also eine charakteristische Verteilung auf die Zellfraktionen. Diese sind bei normalen Ratten von Thiers und Vallee (9) für Cu und Mn ermittelt worden. Unsere entsprechenden Werte für Mn stimmen mit diesen gut überein. Beim Cu ist die Übereinstimmung weniger gut. Tabelle 3 zeigt, daß von Cu, Mo und Co ein beträchtlicher Teil im Cytoplasma liegt. Vom Mn wird nur wenig im Cytoplasma und ein großer Teil in den Kernen und Mitochondrien gefunden. Dies läßt sich mit der starken Komplexbindung des Mn an Nucleinsäuren (17) und dem aktiven Transport von Mn in Mitochondrien (18) erklären. Darüberhinaus gibt es für einzelne Elemente in den verschiedenen Zellfraktionen spezielle Bindungsproteine, für Cu, z. B. Hepatocuprein, Mitochondriocuprein und Metallothionein (19).

Neben derartigen, unterschiedlich lokalisierten intrazellulären Metalloproteinen gibt es noch unterschiedlich auf die Zellfraktionen verteilte Metalloenzyme. Ihre Menge und ihr Beitrag zum spezifischen Verteilungsmuster muß noch bestimmt werden.

Eine Änderung im Gesamtgehalt eines Spurenelements geht nur mit dem Gehalt in den Zellkernen parallel. Dies ist mit Komplexbildung an Nucleinsäuren erklärbar. In den anderen Zellfraktionen findet man keine gleichsinnigen Veränderungen. Die Nebennierenrinden-Hormone haben hier bei den einzelnen Elementen einen unterschiedlichen Effekt. An den Mitochondrien waren die Veränderungen am stärksten.

Verhalten der Spurenelemente im Cytoplasma nach i. v. Injektion radioaktiver Nuklide

Wir haben uns wegen der einfachen Gewinnung und des nativen Zustandes der gelösten Bindungsproteine auf die Überstandsfraction (Cytoplasma) beschränkt. Eine komplette Analyse der Wirkung der Nebennierenrinden-Hormone, die alle Zellorganellen umfaßt, ist deshalb nicht möglich.

Owen (19) fand 30 min nach i. v. Injektion von ^{67}Cu im Cytoplasma 3 Cu-Proteine mit einem Molgewicht von

150 000, 31 000 und 11 000. Das Verhältnis ihrer ^{67}Cu -Aktivität verhielt sich 30 min p. i. wie: 21,0 : 37,6 : 41,5. 24 h nach der Injektion verhielt sich ihre ^{67}Cu -Aktivität wie 4,7 : 93,4 : 1,9. Nach Owen (19) könnte es sich bei den 3 Proteinen um Caeruloplasmin, Hepatocuprein und Metallothionein handeln. Das ^{67}Cu des Metallothionein könnte in Hepatocuprein übergehen.

Co verhielt sich in unseren Versuchen analog. 30 min p. i. fanden wir 3 peaks. Durch Vergleichsproteine mit bekanntem Molgewicht läßt sich für diese peaks ein Molgewicht von 120 000, 30 000 und 9 000 angeben. Sie entsprechen also denen des Cu (19), stehen jedoch in einer anderen quantitativen Relation zu einander. Nach 24 h ist das ^{60}Co ebenfalls fast nur noch im mittleren peak enthalten.

Bei adrenalectomierten Tieren findet man qualitativ das gleiche Verhalten. Die ^{60}Co -Aktivität im niedermolekularen peak III ist jedoch 30 min p. i. relativ höher als in peak I und II (Abb. 1 a).

30 min. p. i. ist ^{99}Mo hauptsächlich im niedermolekularen peak enthalten. Nach 24 h ist Mo praktisch nur noch im hochmolekularen peak nachzuweisen.

Bei adrenalectomierten Ratten wird Mo ebenfalls von peak III in peak I überführt. Peak II war jedoch weder nach 30 min noch nach 24 h zu sehen. Da aber bereits 30 min p. i. etwas Mo wie bei normalen Tieren in peak I war, fehlt bei adrenalectomierten Tieren peak II. Dieser Effekt scheint spezifisch für Mo zu sein (Abb. 1 b).

30 min p. i. sind auch beim Mn 3 peaks zu sehen. Vielleicht existiert noch ein weiterer zwischen peak I und II. Nach 24 h ist die ^{54}Mn Aktivität hauptsächlich im peak III mit dem niedrigsten Molgewicht enthalten. Zwischen normalen und nebennierenlosen Tieren bestand kein qualitativer Unterschied (Abb. 1 c).

Im Cytoplasma der Leber sind verschiedene ^{65}Zn enthaltene Fraktionen gefunden worden (8). Wir erhielten bei der Gelfiltration ebenfalls 5 unterscheidbare ^{65}Zn -enthaltende Fraktionen. Das ^{65}Zn -Spektrum unterscheidet sich jedoch wesentlich von den anderen Elementen. Eine ^{65}Zn -Bindung in Proteinen mit niedrigerem Molgewicht um 10 000 erfolgt unter diesen Bedingungen praktisch nicht. Dies wurde auch von anderen (8) gefunden.

Nach 24 h ist die ^{65}Zn -Aktivität aus den Fraktionen mit dem höchsten Molgewicht in ein Protein mit einem Molgewicht von etwa 20 000 übergegangen. Dieser Prozeß scheint bei adrenalectomierten Tieren verlangsamt (Abb. 1 d).

Bindung radioaktiver Spurenelemente an Proteine des Lebercytoplasma in vitro (Abb. 2).

Die zeitliche Veränderung des Aktivitätsspektrums bei den verschiedenen Spurenelementen läßt den Schluß zu, daß nach i. v. Injektion und der intrazellulären Aufnahme die Spurenelemente zunächst (reversibel) an be-

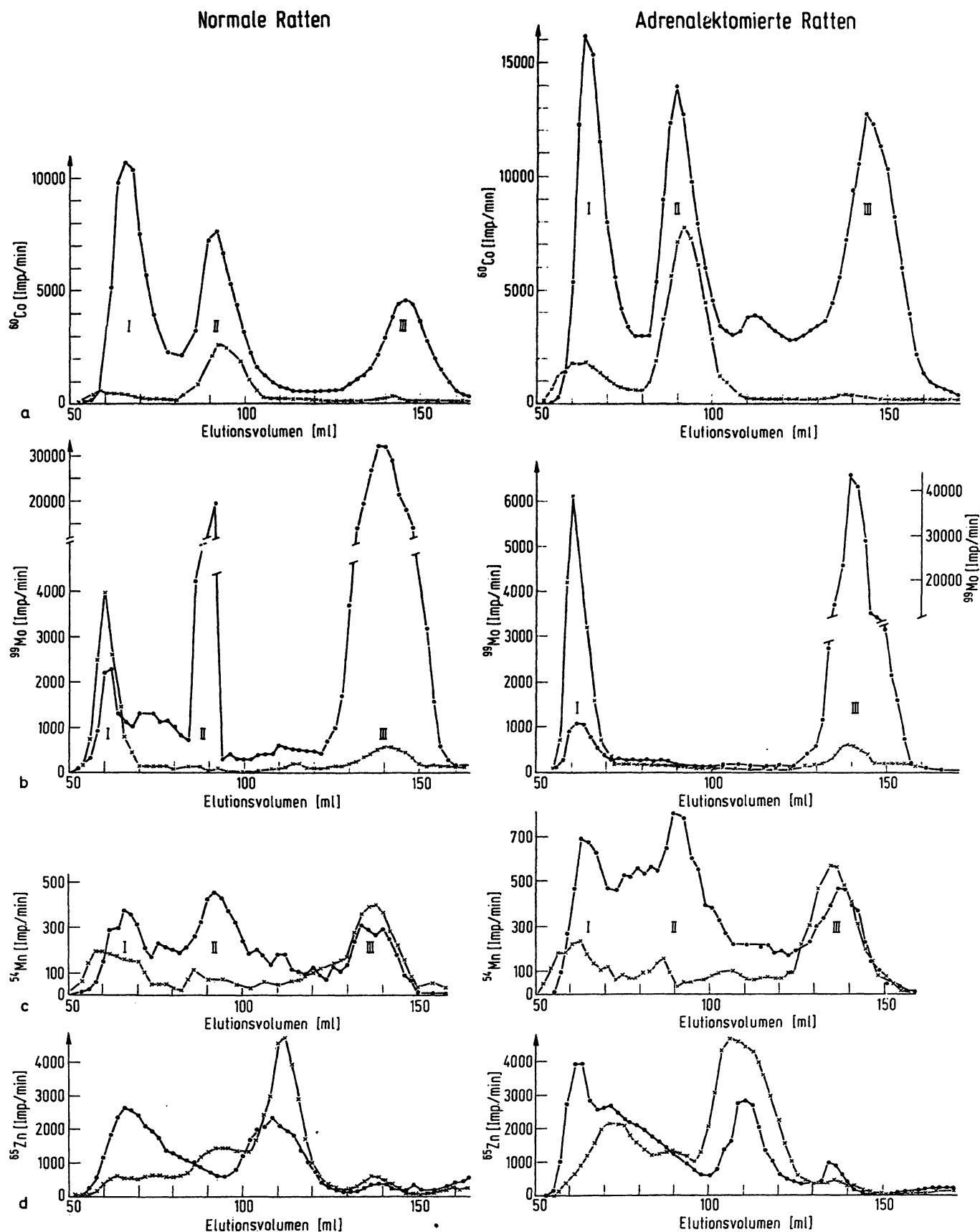


Abb. 1. Elutionsdiagramm des 100.000 g-Überstandes von Leberhomogenaten normaler (links) und adrenalektomierter (rechts) Ratten (Sephadex G 100). ●—● 30 min., x—x 24 h nach intravenöser Injektion der Radionuklide. Einzelheiten s. Methodik.

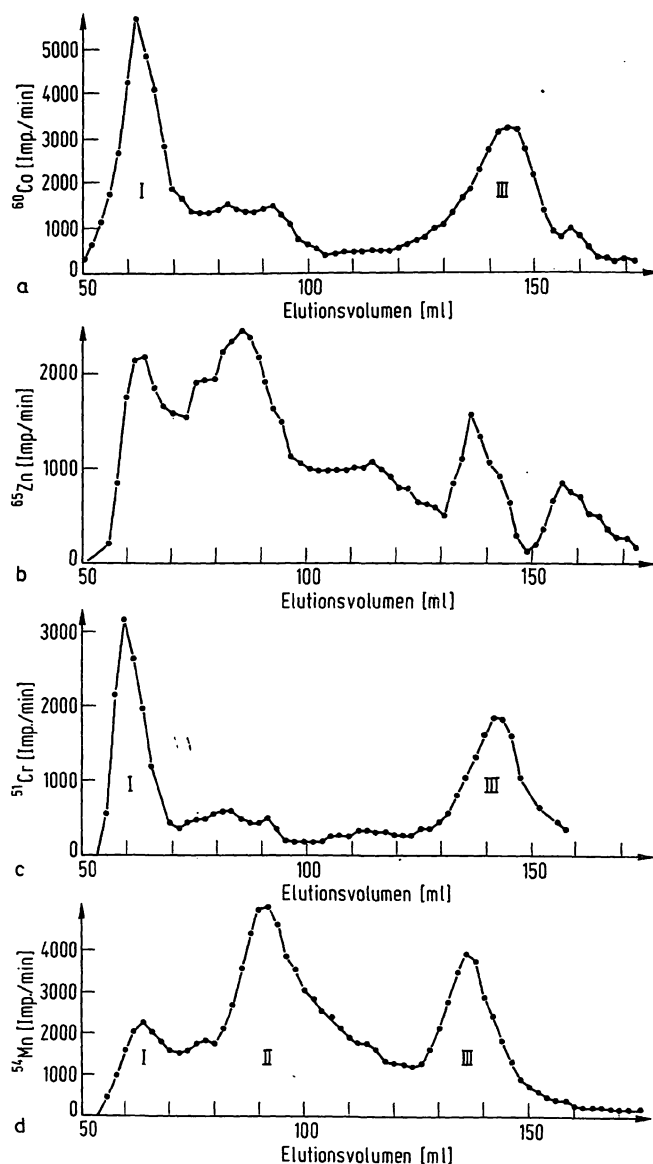


Abb. 2. Elutionsdiagramm des 100.000 g-Überstandes von Leberhomogenaten normaler Ratten. Die Überstände wurden 1 h bei 37 °C mit den verschiedenen Radionukliden geschüttelt und getrennt.

stimmte Proteine gebunden werden. Danach werden die Metalle aus diesen Proteinen (irreversibel) in andere Proteine eingebaut, was wahrscheinlich während der Biosynthese dieser Proteine erfolgt. Zur Überprüfung haben wir Leberhomogenat-Überstand mit radioaktiven Spurenelementen 60 min bei 37 °C geschüttelt und in gleicher Weise fraktioniert.

Es zeigt sich, daß ^{60}Co nur in peak I und III gebunden wird (Abb. 2a). Die in vivo nach 24 h ausschließlich in peak II gefundene Aktivität könnte also bei der Synthese dieses Proteins eingebaut worden sein. (Oder ^{60}Co wird, was wenig wahrscheinlich ist, nur mit extrem langsamer Geschwindigkeit an das Protein im peak II angelagert. Da die Radionuklide trägerfrei injiziert wurden, ändern sich die intrazellulären Konzentrationen nicht. Eine höhere Komplexbildungskonstante des Bindungsproteins im peak II scheidet als Ursache aus, die Aktivität wäre in

diesem Falle sofort im peak II erschienen).

Für ^{65}Zn läßt sich das gleiche ableiten (Abb. 2b). In vitro zugegebenes ^{65}Zn wird hauptsächlich an hochmolekulare Proteine gebunden. Die in vivo erst später auftretende ^{65}Zn -Aktivität in einem Protein mit 20 000 Dalton könnte demnach auch erst bei dessen Biosynthese eingebaut worden sein.

Die nach Injektion von ^{51}Cr im Cytoplasma nachweisbare ^{51}Cr -Aktivität war sehr gering (wahrscheinlich wegen der hohen ^{51}Cr -Bindung an Erythrocyten), so daß die ^{51}Cr -Verteilung deshalb nur nach in vitro-Zugabe untersucht wurde (Abb. 2c). Dabei zeigte sich das gleiche Muster wie bei ^{60}Co .

Nach ^{54}Mn -Zugabe zur Überstandsfraction erhält man das gleiche Aktivitätsmuster wie 30 min p.i. (Abb. 2d). Da alle peaks sofort vorhanden sind, besonders peak III, der 24 h p.i. fast die gesamte Aktivität enthält, scheint das Verschwinden von peak I und II 24 h p.i. auf einer Ausscheidung von ^{54}Mn zu beruhen. Das Zurückbleiben der Aktivität in peak III ließe sich mit einer höheren Mn-Komplexbildungskonstanten und einem irreversiblen Einbau von ^{54}Mn bei der Synthese eines Proteins erklären.

Bindung von Spurenelementen bei Cd-behandelten Tieren (Abb. 3)

Ein metallbindendes Protein kann durch Injektion von CdCl_2 induziert werden (7). Bei Cd-behandelten Ratten findet man bereits 30 min p.i. einen höheren Teil der cytoplasmatischen ^{65}Zn -Aktivität in einem Protein mit mittlerem Molgewicht (Abb. 3a). Dieses Protein nahm bei in vitro-Inkubation mit ^{65}Zn keine Aktivität auf, d. h. ^{65}Zn wird wahrscheinlich nur bei der Synthese dieses Proteins eingebaut. Aus dem schnellen ^{65}Zn -Einbau in diese Fraction nach Vorbehandlung mit Cd kann man schließen, daß dieses Protein jetzt eine höhere Syntheserate aufweist.

Bei Cd-behandelten Tieren ist die ^{60}Co -Aktivität 30 min p.i. sehr niedrig (Abb. 3b), was auf eine durch Cd gehemmte intrazelluläre Aufnahme hinweist. Nach 24 h ist ein wesentlich höherer Anteil als bei normalen Tieren im Protein mit mittlerem Molgewicht eingebaut. Daraus kann ebenfalls auf eine vermehrte Synthese dieses Proteins geschlossen werden.

Die ^{54}Mn -Bindung an Proteine ist bei Cd-behandelten Tieren unverändert (Abb. 3c). Die am Mn-turnover beteiligten Proteine scheinen demnach durch Cd nicht induziert zu werden.

Ein Elutionsdiagramm der cytoplasmatischen Proteine von Rattenleber zum Vergleich mit den Abbildungen 1–3 enthält die Abbildung 4.

Zur Funktion der cytoplasmatischen Bindungsproteine

Über Bindungsart und Wertigkeit der Spurenelemente in diesen Bindungsproteinen läßt sich nichts aussagen.

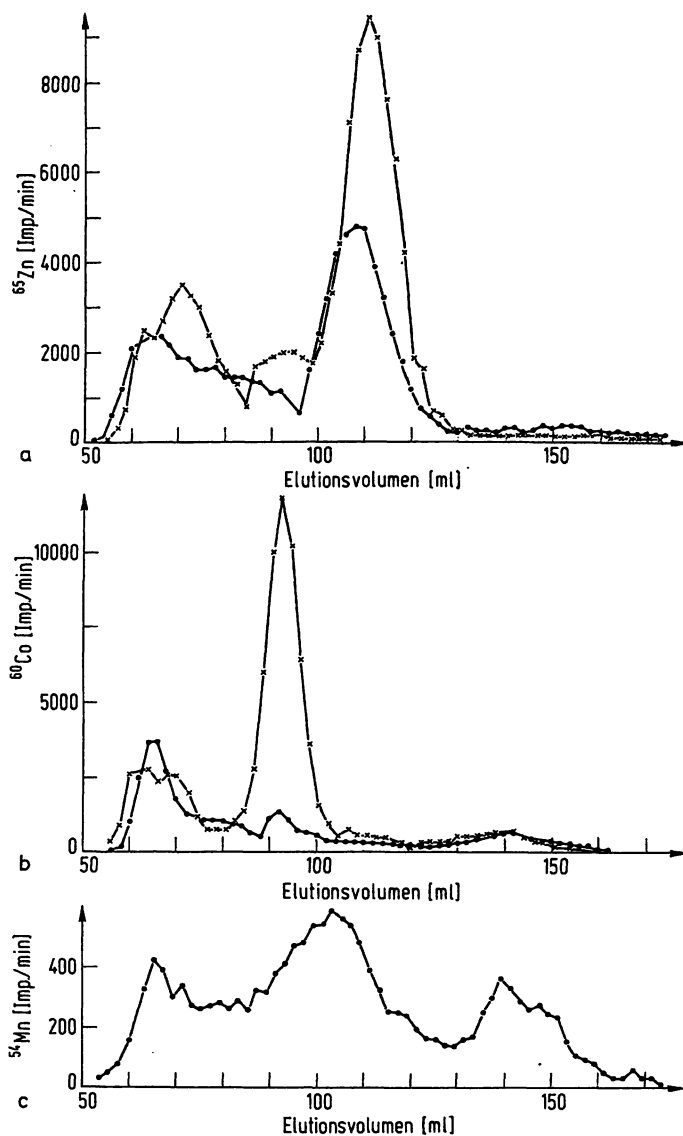


Abb. 3. Elutionsdiagramm des 100.000 g-Überstandes von Leberhomogenaten Cd-behandelter Ratten. Den Tieren wurde 24 h vor der i. v.-Injektion der radioaktiven Spurenelemente $22 \mu\text{mol CdCl}_2/\text{kg i. p.}$ injiziert. —•— 30 min, x—x 24 h nach Injektion der Radionuklide.

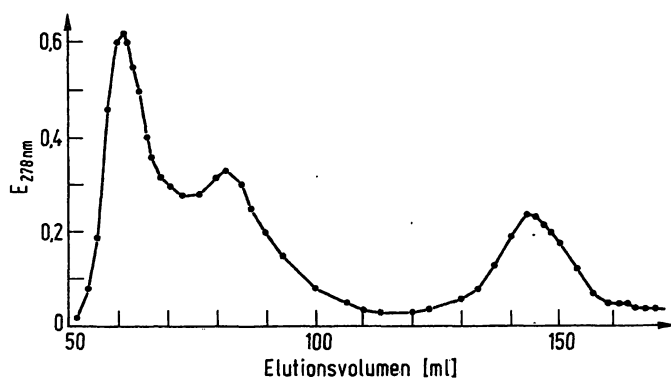


Abb. 4. Elutionsdiagramm des 100.000 g-Überstandes eines Rattenleberhomogenates. Extinktionsmessung bei 278 nm.

Die Struktur und Spezifität dieser Proteine sind ebenfalls noch ungeklärt. Wegen der hohen Komplexbildungskonstanten dieser Spurenelemente und der Existenz spezieller Bindungsproteine ist anzunehmen, daß diese Spurenelemente, wie für Zn bereits gezeigt (3), praktisch ausschließlich in gebundener Form vorliegen. Die Konzentration der freien Ionen, die im Gleichgewicht mit dem Chelat vorliegen müssen, ist wegen der Größe der Komplexbildungskonstanten praktisch zu vernachlässigen. Die quantitativen Zusammenhänge werden bei den Bindungsproteinen (X), die das Metallion (M) reversibel binden können, analog der *Henderson-Hasselbalch-Gleichung* $pM = pK + \log \frac{X}{MX}$ beschrieben, wobei pM der negative Logarithmus der Metallionenaktivität (M), pK der negative Logarithmus der Dissoziationskonstanten K und MX die Konzentration des Chelats ist. Die Änderung der Konzentration eines Spurenelements in einer Zellfraktion kommt daher praktisch nur durch Zu- oder Abnahme von MX zustande. Als Ursache käme eine Änderung des pM oder eine Änderung des Gehalts von X in Frage. Eine Abnahme des pM ist möglich durch Mangel oder Verlust, eine Zunahme des pM durch Überangebot (Vergiftung).

Der Gehalt an Bindungsproteinen (X) wäre durch Induktion oder Repression zu ändern. Auf diese Weise könnten die Nebennierenrinden-Hormone wirksam werden. Daß Nebennierenrinden-Hormone derartige Wirkungen entfalten können, ist bekannt. Darüberhinaus könnte auch die Änderung des pM , wie im Fall einer Injektion von Zn (oder Cd), nicht aber z. B. von Co oder Ni (7), die Synthese eines bestimmten Bindungsproteins induzieren.

Den intrazellulären Bindungsproteinen könnte eine Funktion beim Transport von Metallionen innerhalb der Zelle und als Speicher für Metallionen zukommen. Aus dem Speicher könnte ihr Einbau in Enzyme erfolgen, indem das Speicherprotein, welches das Metallion in nicht austauschbarer Form enthält, (in regulierbarer Weise) abgebaut wird. Durch die Bindung an spezielle Bindungsproteine könnte gleichzeitig eine Schutzfunktion ausgeübt werden, indem andere Enzymproteine mit wirksamen SH-Gruppen vor einer Inhibierung durch diese Metallionen geschützt werden. Die Induktion Metallionen-bindender Proteine nach Zufuhr größerer Mengen Zn oder Cd würde sich hier sinnvoll einordnen.

Radionuklide im Serum (Abb. 5)

Bereits 30 min nach i. v. Injektion war soviel ^{54}Mn und ^{65}Zn in die Organe aufgenommen worden, daß auf dem Elektropherogramm des Serums kaum noch Radioaktivität vorhanden war. Die sehr schnelle Aufnahme von ^{65}Zn in Leber und Niere nach i. v. Injektion hatten wir schon in früheren Versuchen gefunden (10). Die Bindung der Radionuklide an die elektrophoretisch trennbaren Serumproteine wurde deshalb nach in vitro-Zugabe der Nuklide untersucht. Lediglich nach i. v. Injektion

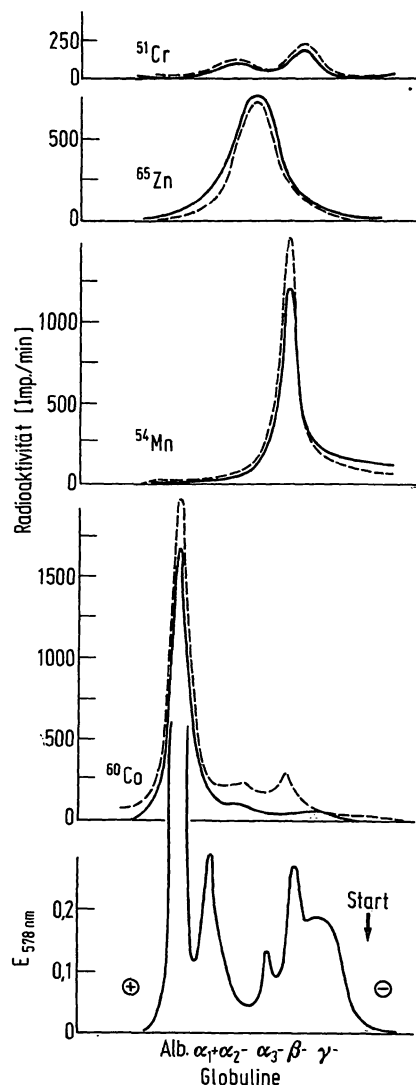


Abb. 5. Radio-Elektropherogramme von Rattenserum, das 60 min bei 25 °C mit verschiedenen Radionukliden geschüttelt wurde.
 — Serum von Normaltieren
 - - - Serum von adrenalectomierten Tieren
 E_{578 nm}: Photometrische Auswertung der Elektrophoresestreifen nach Färbung mit Ponceau S.

von ^{60}Co ließen sich noch Radio-Elektropherogramme mit ausreichender Aktivität herstellen, die die gleiche Verteilung der ^{60}Co -Aktivität wie nach Zugabe in vitro ergaben. Das langsame Verschwinden von ^{60}Co (aus dem Serum-Albumin) stimmt überein mit einer langsameren

intrazellulären Aufnahme des ^{60}Co im Vergleich zu ^{65}Zn und ^{54}Mn (nicht dargestellt).

^{65}Zn befand sich in einer breiten Bande im Bereich des α_2 -Globulins. Damit übereinstimmend hat Vallee (14) ein α_2 -Globulin mit einem Zn-Gehalt von 400–700 $\mu\text{g/g}$ isoliert, so daß es sich hierbei um das Zn-bindende Protein des Serums handeln kann. Der Zn-enthaltende peak ist jedoch so breit, daß Zn auch im Transferrin gebunden sein kann. Bei adrenalectomierten Tieren ergab sich die gleiche Verteilung.

Bei normalen und adrenalectomierten Ratten war das in vitro zugesetzte ^{54}Mn nur an Transferrin gebunden.

^{51}Cr wird bei normalen und adrenalectomierten Tieren an Transferrin und an α -Globulin gebunden.

^{60}Co wird bei beiden Versuchsgruppen hauptsächlich im Albumin gefunden. Darüberhinaus erscheint bei adrenalectomierten Tieren in geringer Menge eine Co-bindende Fraktion in den β -Globulinen, die nach ihrer Lage Transferrin sein kann.

Nach Ergebnissen von Aisen et al (20) sind Mn, Co und Cr als dreiwertige Kationen an Tyrosylreste unter Beteiligung von HCO_3^- an das Apotransferrin gebunden. Die Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} erfolgt durch Luft- O_2 . Dies würde erklären, warum nach in vitro-Zugabe von ^{54}Mn dieses im Transferrin erscheint. Das zugegebene dreiwertige ^{51}Cr könnte direkt an Transferrin angelagert werden. Das schwer oxidierbare ^{60}Co findet sich nach in vitro-Zugabe im Albumin. Bei adrenalectomierten Tieren ist nach i.v. Injektion etwas Co an Transferrin gebunden. Co wird wahrscheinlich erst mit H_2O_2 in der Zelle zu Co^{3+} oxidiert, bevor es an Transferrin gebunden werden kann. Bei adrenalectomierten Tieren scheint dieser Prozeß beschleunigt zu sein. Neben einer Bindung des Co^{3+} an Transferrin ist Albumin als Transportprotein für Co^{2+} anzusehen. In dieses Schema paßt das Verhalten des Zn^{2+} , das nach in vitro-Zugabe im α_2 -Globulin und nur in geringem Maße im Transferrin auftritt. Unter bestimmten Bedingungen ist es auch möglich, in vitro Zn^{2+} an isoliertes Transferrin zu binden (16). Vielleicht sind hierzu strukturelle Änderungen am Transferrin nötig. Cu ist sofort nach der Injektion an ein Serum-Protein gebunden (5), wahrscheinlich Transferrin (16). Erst eine Stunde p.i. beginnt in der Leber der Cu-Einbau in Caeruloplasmin (5), das danach im Serum erscheint.

Literatur

- Malmström, B. G. & Neilands, J. B. (1964) Ann. Rev. Biochem. 33, 331–354.
- Comar, C. L. & Bronner, F. (1962) Mineral Metabolism, Vol. IIB Academic Press
- Reinhold, J. G., Arslanian, M. & Bitar, K. (1970) Biochim. Biophys. Acta 215, 430–437.
- Huber, A. M. & Gershoff, S. N. (1973) J. Nutr. 103, 1175–1181.
- Owen jr., C. A. (1965) Amer. J. Physiol. 209, 900–904.
- Evans, G. W. Majors, P. F. & Cornatzer, W. E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1142–1148.
- Webb, M. (1972) Biochem. Pharm. 21, 2751–2765.
- Shaikh, Z. A. & Lucis, O. J. (1972) Arch. Environ. Health 24, 419–425.
- Thiers, R. E. & Vallee, B. J. (1957) J. Biol. Chem. 226, 911–920.
- Dorn, F. & Günther, T. (1970) diese Z. 8, 618–620.
- Günther, T. & Alter, C. (1967) diese Z. 5, 67–72.
- Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. (1950) J. Biol. Chem. 183, 123–128.
- Kägi, J. H. R. & Vallee, B. L. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2435–2442.

14. Pulido, P., Kägi, J. H. R. & Vallee, B. L. (1966) *Biochem. J.* 106, 1768–1777.
15. Parisi, A. F. & Vallee, B. L. (1969) *Amer. J. Clin. Nutr.* 22, 1222–1239.
16. Aasa, R., Malmström, B. G., Saltman, P. & Vänngård, T. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 75, 203–222.
17. Eisinger, J., Fawaz-Estrup, F. & Shulman, R. G. (1965) *J. Chem. Phys.* 42, 43–53.
18. Puscin, J. S. & Gunter, T. E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 275, 302–307.
19. Terao, T. & Owen jr, C.A. (1973) *Amer. J. Physiol.* 224, 682–686.
20. Aisen, P., Aasa, R. & Redfield, A. G. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4628–4633.

Prof. Dr. Th. Günther
1000 Berlin 33,
Arnimallee 22